MicroRNA-186-5p 在酒精诱导的心肌细胞中高表达并通过靶基因 XIAP 调控细胞凋亡水平

MicroRNA-186 is Expressed Highly in Ethanol-induced Cardiomyocytes and Regulates Apoptosis by Target Gene XIAP

刘叶*，潘玥，郑魏，胡晶
（121000，辽宁省锦州市，锦州医科大学附属第一医院心电中心）

LIU Ye, PAN Yue, ZHENG Wei, HU Jing
（Electrocardial Center of the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University. Jinzhou City 121000, Liaoning Province-China）

[摘要]目的：证实酒精可诱导 AC16 心肌细胞凋亡及其与酒精浓度和作用时间的关系，研究不同浓度酒精干预下 AC16 心肌细胞中 miR-186-5p 与 X 连锁凋亡抑制蛋白（XIAP）表达水平以及心肌细胞凋亡水平的改变，探究 miR-186-5p 以 XIAP 为靶基因调控酒精诱导的心肌细胞凋亡。**方法:**流式细胞术检测细胞凋亡水平，Western Blot、实时定量 PCR 技术分别在蛋白及基因水平检测细胞 miR-186-5p 与 XIAP 表达水平的变化，双荧光素酶报告基因靶基因荧光检测 miR-186-5p 与 XIAP 的靶际关系。**结果:**酒精诱导 AC16 心肌细胞发生凋亡，且与酒精浓度及作用时间呈正相关；酒精摄入上调 AC16 心肌细胞中 miR-186-5p 表达,下调 XIAP 表达；miR-186-5p 参与酒精诱导的 AC16 心肌细胞凋亡过程，XIAP 抑制酒精诱导的 AC16 心肌细胞凋亡；miR-186-5p 以 XIAP 为靶基因调控酒精诱导的心肌细胞凋亡。**结论：**AC16 心肌细胞经过酒精处理后，细胞的凋亡水平升高，并且随着酒精作用浓度和作用时间的延长，凋亡水平进一步升高；酒精处理后心肌细胞中

*第一作者、通讯作者，辽宁省锦州市古塔区人民街五段 2 号锦州医科大学附属第一医院心电中心，121000. 邮箱：601924547@qq.com. 电话 13505065295

基金项目：辽宁省自然科学基金指导计划:MicroRNA-186-5p 在酒精诱导的心肌细胞中表达并通过靶基因 XIAP 调控细胞凋亡水平，项目编号 20180550419

miR-186-5p 表达量上调，XIAP 表达量下调，miR-186-5p 以 XIAP 为靶基因，调控酒精处理后心肌细胞的凋亡。

关键词：心肌细胞 细胞凋亡 microRNA-186-5p XIAP 酒精性心肌病

中图分类号：R542.2

[Abstract] **Objective:** To confirm the effect of alcohol-induced apoptosis of AC16 cardiomyocytes and the relationship with the alcohol concentration and the action time.To investigate the expression levels of miR-186-5p and X-linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP) along with the variational apoptosis level in alcohol -treated AC16 cardiomyocytes with different concentrations. To explore miR-186-5p regulated apoptosis of alcohol-induced cardiomyocytes using XIAP as the target gene,.**Methods:** Flow cytometry analyzed the expression levels of cardiomyocyte apoptosis. Western blot and real-time PCR detected respectly the protein and RNA expression levels of miR-186-5p and XIAP in alcohol-treated AC16 cardiomyocytes. Luciferase reporter gene experiment verified that XIAP is a direct target gene of miR-186-5p.**Results:** Alcohol induced cardiomyocyte apoptosis, and the levels of apoptosis were dependent on alcohol concentration and duration of time.Alcohol intake can increase the expression levels of miR-186-5p and decrease the expression levels of XIAP in AC16 cardiomyocytes. MiR-186-5p was involved in alcohol-induced the process of AC16 cardiomyocyte apoptosis.XIAP can inhibite alcohol-induced AC16

cardiomyocyte apoptosis.MiR-186-5p targets XIAP as a target gene to regulate alcohol-induced cardiomyocyte apoptosis.**Conclusion**: The levels of apoptosis in AC16 cardiomyocytes increase after alcohol treatment and increase further with the increase of alcohol concentration and the prolongation of the action time. The expression levels of miR-186-5p increase, and the expression levels of XIAP decrease in alcohol-treated AC16 cardiomyocytes. MiR-186-5p regulates apoptosis of alcohol-induced cardiomyocytes using XIAP as the target gene.

[Keywords]cardiomyocyte;apoptosis;microRNA-186-5p;XIAP;alcoholic cardiomyopathy;

[Chinese library classification number] R542.2

酒精对心脏有毒性作用，产生心肌细胞损伤。长期大量摄入酒精导致非缺血性扩张型心肌病称之为酒精性心肌病（alcoholic cardiomyopathy，ACM）[1]，ACM 的特点是心肌肥厚和代偿性心脏收缩障碍[2]。在 ACM 的发病过程中，心肌细胞的凋亡发挥重要作用，X 连锁凋亡抑制蛋白（X-linked inhibitor of apoptosis protein，XIAP）是凋亡家族蛋白抑制剂（inhibitor of apoptosis family of proteins，IAP）中的一员，是当前已知的人的组织细胞中最有效的 IAP 蛋白[3]。XIAP 可以抑制由病毒感染或者 caspase 家族蛋白表达过量引发的细胞凋亡。MicroRNA 是一类长度约为 21-23 个核苷酸的调控小 RNA 分子，目前的研究已发现有 13 个 microRNA 参与调节心肌肥厚的发生、发展，提示 microRNA 含量水平的异常在心脏的肥大，病理性重构以及心衰的发生过程中发挥重要作用[4]。而针对酒精诱发的心肌病，研究发现在肥大的心肌组织中检测到了多个 microRNA 的表达水平发生异常，包括 miR-133a，miR-125，miR-195 等[5]，提示 ACM 可能与部分 microRNA 表达异常相关。

我们的前期工作中已经筛选出的 ACM 相关差异性表达的 microRNA（如

miR-186-5p、 miR-488-3p 等）。 并通过 TargetScan 生物信息学软件预测 miR-186-5p 相关的 949 个靶基因，发现 XIAP 为 miR-186-5p 的靶基因。XIAP 是人组织细胞中重要的抑凋亡蛋白，但其在酒精诱导的心肌病的功能还未见报道。

在本实验中，我们首先通过流式细胞术分析经过酒精处理的人源性 AC16 心肌细胞[6]的凋亡水平变化。接着检测酒精处理后的 AC16 心肌细胞中 miR-186-5p 的变化及凋亡蛋白抑制剂 XIAP 的表达水平变化并探究酒精诱导心肌细胞发生凋亡的具体分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

AC16 人心肌细胞来源于人左心室心肌细胞，购自广州晟雷生物科技有限公司储存于本院中心实验室，无水酒精购自国药集团，F12 培养基购自美国 Gibco 公司，MTT 试剂盒、RNA 提取试剂 TRIZOL 购自美国 sigma 公司，反转录试剂购自日本 TAKARA 公司，DharmaFECT 转染试剂购自美国 Dharmacon 公司，荧光素酶报告基因质粒载体（pmir GLO）购自上海吉玛制药技术有限公司，MicroRNA-186-5p mimic/inhibitor 购自广州锐博生物技术科技有线公司，miR-186 引物购自上海生电生物公司，XIAP 质粒、定量 PCR 试剂 SYBR Master Mix 、Lipofectamine 3000、ACTIN 抗体、XIAP 抗体、羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗、ECL 显色试剂盒均购自美国 Cell Signaling Technology 公司，荧光素酶报告基因试剂盒购自 Promega 公司，Annexin V/PI 试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测

取对数生长期的细胞，待细胞密度 60%-70%时，将细胞接种于 6 孔板内给予酒精浓度 0 mmol/L-24h、48h，200 mmol/L-24h、48h，800 mmol/L-24h、48h 于 CO_2 孵箱中继续培养，将培育的孔板从恒温孵箱取出，每孔加入 0.25%的胰蛋白酶进行消化，离心后去除上清液，清洗细胞后每管加入 100ul1×binding buffer。轻轻弹均细胞，每管加入 3ul Annexin V FITC 轻轻弹均，避光条件下静置 15 分钟。每管中加入 200ul1×binding buffer 弹均，采用流式细胞仪检测和分析细胞凋亡。实验重复 5 次，取平均值。

1.2.2 双荧光素酶报告基因靶基因荧光检测

利用生物信息学软件（TargetScan7.1），预测 miR-186 调控 XIAP 基因结合序列，设计合成 XIAP 3′-UTR 序列及突变后 XIAP3′-UTR 序列，将合成的两种目的基因片段分别克隆到 pmir GLO 荧光素酶报告基因载体，构建 XIAP 3′-UTR 双荧光素酶报告基因野生型载体（pmir GLO-wt-XIAP）及其突变型载体（pmir GLO-mut-XIAP）。

使用转染试剂 lipofectamine TM 3000 分别将这两种重组载体质粒与 miR-186 mimic（miRNA mimic 是模拟生物体内源的 miRNAs，运用化学合成的方法合成，能增强内源性 miRNA 的功能。本实验中 microRNA-186-5p mimic 购于广州锐博生物技术科技有限公司）或 miR-186 阴性对照（mimic Control）共同转染 AC16 心肌细胞。

转染分组如下：

共转染	miR-186-5p mimic control	pmir GLO-wt-XIAP-3′-UTR
共转染	miR-186-5p mimic	pmir GLO-wt-XIAP-3′-UTR
共转染	miR-186-5p mimic control	pmir GLO-mut-XIAP-3′-UTR
共转染	miR-186-5p mimic	pmir GLO-mut-XIAP-3′-UTR

转染后 48h，检测荧光素酶活性。

实验重复 5 次。

1.2.3 Western Blot

应用蛋白裂解液 RIPA 及 PMSF 冰上提取蛋白，考马斯亮兰法(Bradford 法)[7]行蛋白定量。应用 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液制备蛋白样本，将 20μg 样品加入到 SDS-PAGE 胶加样孔中，本实验所用浓缩胶的浓度为 5%，分离胶的浓度为 10%。每孔上样液上样量为 15μl，最后左右各加入 5μl 蛋白 Marker，连通电极，调整电压 80V 直到蛋白 Marker 的前沿从浓缩胶进入分离胶。调整电压为 120V，恒压电泳，观察蛋白 Marker 分离情况，适时停止电泳。冰浴 100 V 转膜 90 min。置于 1.5% BSA 封闭液中室温封闭 2 h。用 1.5%BSA 稀释一抗 XIAP(1:1000)，ACTIN(1:400)，4° C 孵育过夜，按抗体说明书建议的稀释倍数稀释二抗，37° C 孵箱孵育 2 小时.。二抗摇床上室温孵育 1 h，二抗稀释浓度 1∶10 000。ECL 曝光显色，用图像分析系统进行分析，实验重复 5 次。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

应用 Trizol 一步法提取心肌细胞总 RNA；取总 RNA 1 μg，在 20 μL 逆转

录体系中合成 cDNA；将 0.5μL 上述所得 cDNA 及靶基因上下游引物加入 20μL 体系中进行 PCR 扩增。反应条件：37℃ 30min；85℃ 5min. 引物序列如下，miR-186 上游引物 5′-GCGCTAAGGCACGCGGT-3′，下游引物 5′-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3′；XIAP 上游引物 5′-GGCACGAGCAGGGTTTCTT-3′，下游引物 5′-TCCAACTGCTGAGTCTCCATATTG-3′。确认的扩增曲线和溶解曲线,基因相对表达量的测算参照 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 方法。实验重复 5 次。

1.2.5 细胞转染

100ul 无血清培养基+4.5ul 转染试剂（Lipo-fectamine 3000）+1.2ug 质粒，温育 15min。细胞消化后均匀的接种到 6 孔培养板中，继续培养，待细胞生长至单层密度 70%时进行转染：先用无血清培养基对细胞进行饥饿处理 2 小时；用微量移液器将转染混合液逐滴加入孔中，放入 37℃恒温孵育箱中孵育（37℃，5%CO2,5h）；吸弃转染培养基，添加含 10%胎牛血清的完全培养基放入 37℃恒温孵育箱中继续培养（37℃，5%CO2，24 小时）。收集细胞进行后续实验检测。实验重复 5 次。

1.2.6 统计分析

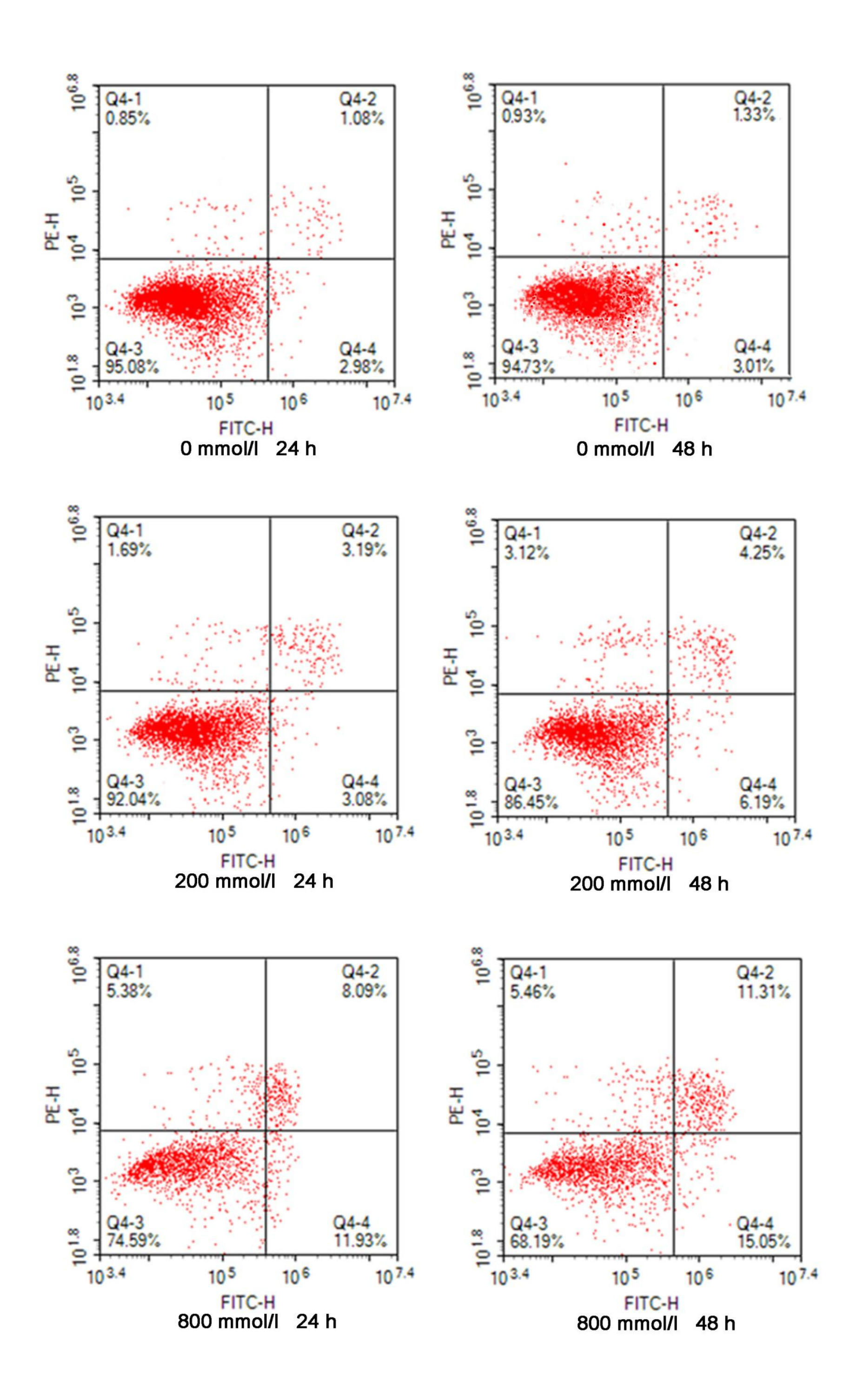
数据统计分析所用软件为 SPSS16.0。分析处理组与对照组之间所得数据采用单因素方差分析方法进行分析。$P<0.05$ 表示组间比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酒精诱导 AC16 心肌细胞发生凋亡

用不同浓度的酒精（0mmol/L,200mmol/L，800mmol/L）对 AC16 心肌细胞分别处理不同时间（24 h，48 h），然后通过流式细胞术分析不同浓度酒精不同作用时间对 AC16 细胞凋亡水平产生的影响。如图 1 所示，Q4-1：此区域的细胞为坏死细胞及机械损伤的细胞；Q4-2:此区域的细胞为晚期凋亡细胞；Q4-3：此区域的细胞为活细胞。Q4-4：此区域的细胞为早期凋亡细胞。0 mmol/L(24 h 或 48 h)组是对照组,而 200 mmol/L (24 h 或 48 h)和 800 mmol/L (24 h 或 48 h)组为实验组。结果表明，与对照组相比，酒精处理后 AC16 心肌细胞凋亡水平升高，差异有统计学意义,➢$P<0.05$ vs 对照组，差异有显著统计学意义，➢➢$P<0.01$ vs

对照组。提示：酒精可诱导 AC16 心肌细胞发生凋亡，且与酒精浓度和作用时间呈正相关。



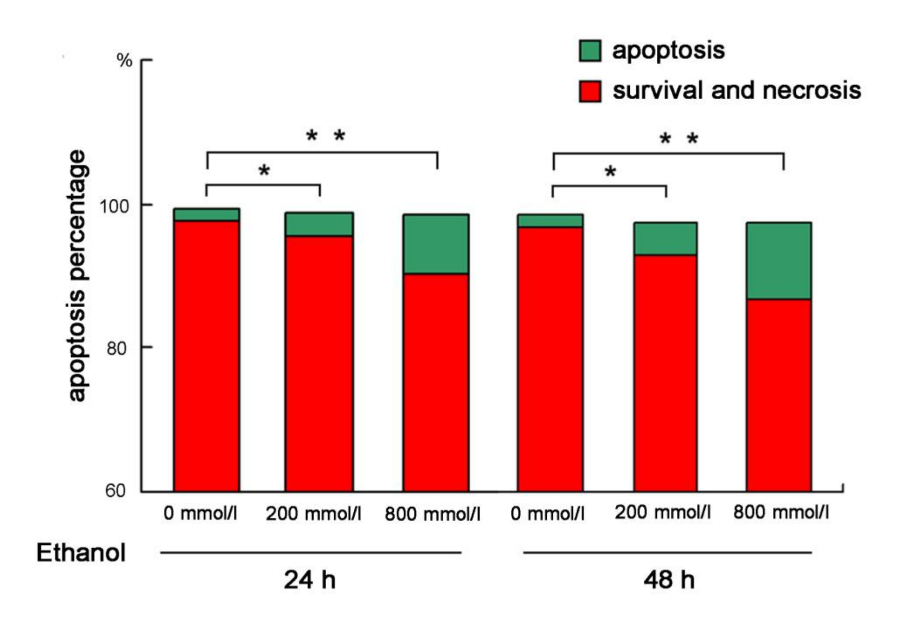


图 1 流式细胞术分析酒精处理后的 AC16 心肌细胞的凋亡水平。

Figure 1. Flow cytometry analyzes the expression levels of alcohol-induced cardiomyocyte apoptosis.

Q4-1: the cells in this area are necrotic cells and mechanical injury-cells;Q4-2: the cells in this area are late-stage apoptotic cells.Q4-3: cells in this area are iving cells.Q4-4: cells in this area are early-stage apoptotic cells.

2.2 验证 XIAP 是 miR-186 的直接作用的靶基因

生物信息学软件 Target Scan7.1 数据库预测，XIAP 基因 mRNA 3′-UTR 的第 332-338 碱基位置是与 miR-186 可能的结合位点；同时在 miRanda 数据库上也发现 XIAP 基因 mRNA3′-UTR 与 miR-186 互补结合序列，二者之间结合稳定性较好，miR-186 下调 XIAP 表达的可能性较大。

为了进一步证实 XIAP 是否是 miR-186-5P 的直接目标靶基因，我们采用 DualLuciferase 报告基因实验进行分析、实时定量 PCR 进行靶基因验证。首先我们构建野生型 pmir GLO-wt-XIAP-3′-UTR 和突变型 pmir GLO-mut-XIAP-3′-UTR 分别与 miR-186-5p mimic control 和 miR-186-5p mimic 共同转染 AC16 心肌细胞（如图 2 所示）。结果表明：野生型 pmir GLO-wt-XIAP-3′-UTR 与 miR-186-5p mimic 结合后对照其他三组荧光强度降低，比较有统计学差异（P<0.05）；其他三组间比较，各组荧光强度无显著差别，P>0.05。提示 XIAP 的 3′-UTR 区有 miR-186 直接结合的位点，miR-186 可靶向抑制 XIAP 的表达，因此 XIAP 是 miR-186 直接作用的靶基因。

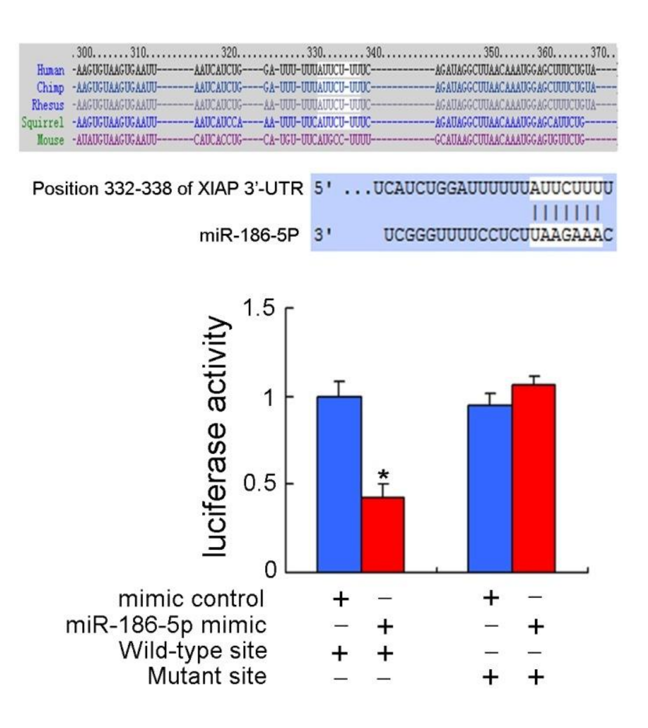


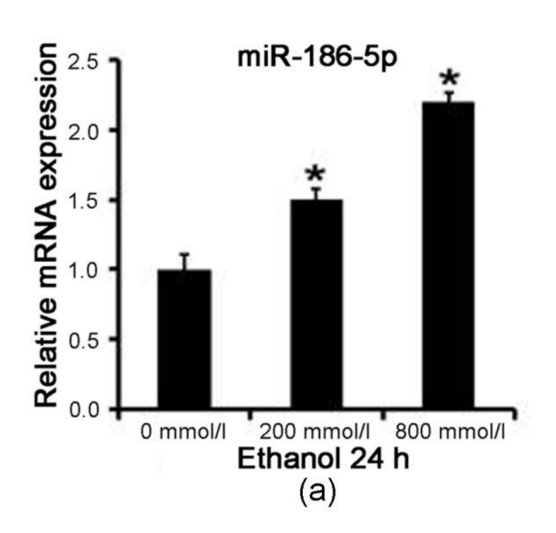
图 2 荧光素酶报告基因验证 XIAP 是 miR-186-5p 的直接作用靶点。

Figure 2.Luciferase reporter gene experiment verifies that XIAP is a direct target gene of miR-186-5p.

The results showed fluorescence intensity in the group of the wild-type pmirGLO-wt-XIAP-3′-UTR combined with miR-186-5p mimic decreased compared with the other three groups, which showed a statistically significant difference (➢P<0.05 vs the other three groups), and no significant difference was observed in fluorescence intensity among the other three groups(P>0.05).

2.3 酒精摄入上调 AC16 心肌细胞中 miR-186-5p 表达上调

将 AC16 心肌细胞用酒精进行处理，并通过实时荧光定量 PCR 的方法检测细胞中 miR-186-5p 的表达水平。结果如图 3 所示：(图 3a) 实时荧光定量 PCR 检测不同浓度酒精干预AC16心肌细胞24 h后miR-186-5p的RNA表达水平。0 mmol/L 组为对照组， 200 mmol/L, 800 mmol/L 为实验组。实验组较对照组相比，细胞中 miR-186-5p 的 RNA 表达水平升高，差异有统计学意义,➢P<0.05 vs 对照组。(图 3b) 实时荧光定量 PCR 检测 800 mmol/L 浓度的酒精予以不同时间干预 AC16 心肌细胞后，miR-186-5p 的 RNA 表达水平。0 h 为对照组，24 h、48 h 为实验组。实验组与对照组相比，细胞中 miR-186-5p 的 RNA 表达水平升高，差异有统计学意义，➢ P<0.05 vs 对照组。提示酒精能够上调 AC16 心肌细胞中 miR-186-5p 的表达水平，且随着酒精浓度的增加以及作用时间的延长，miR-186-5p 的表达水平进一步升高。



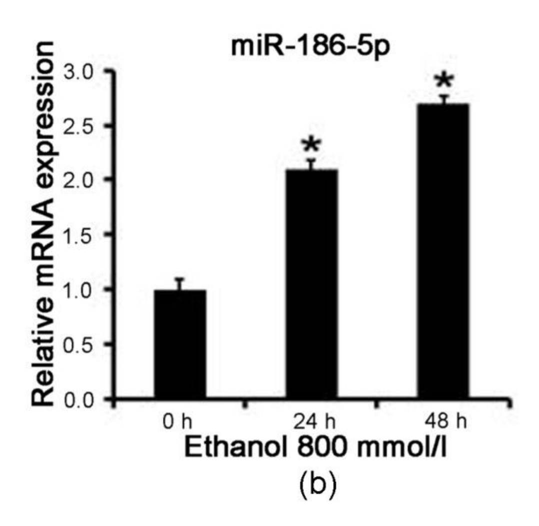


图 3 实时荧光定量 PCR 检测酒精处理后 AC16 心肌细胞中 miR-186-5P 的表达水平。

Figure 3.Real-time PCR detects the expression levels of miR-186-5p in alcohol-treated AC16 cardiomyocytes.

2.4 酒精摄入下调 AC16 心肌细胞中凋亡相关蛋白 XIAP 表达水平

为了探明酒精诱导心肌细胞发生凋亡的具体机制，本研究通过 Western Blot 方法检测 AC16 心肌细胞经过酒精处理后凋亡相关指标的表达水平。结果如图 4 所示:图 4(a)示 Western Blot 检测不同浓度的酒精处理 AC16 心肌细胞 24 h 后，XIAP 蛋白表达水平。0 mmol/L 组为对照组，200 mmol/L 组、800 mmol/L 组为实验组。实验组与对照组比较，XIAP 的蛋白表达水平降低。图 4(b)示 Western Blot 检测 800 mmol/L 酒精予以不同时间干预后 AC16 心肌细胞 XIAP 蛋白表达水平。0 h 为对照组，24 h、48 h 为实验组。实验组与对照组比较，细胞中 XIAP 的蛋白表达水平降低。图 4(c)、图 4(d)通过曝光的灰度值计算 XIAP 蛋白表达量：0 mmol/L 组和 0 h 组分别为对照组，200 mmol/L 组，800 mmol/L 组和 24 h 组、48 h 组分别为实验组，实验组与对照组比较，XIAP 蛋白表达水平降低，差异有统计学意义，#P<0.05 vs 对照组。图 4(e)示实时荧光定量 PCR 检测不同浓度的酒精处理 AC16 心肌细胞 24 小时后 XIAP 的 RNA 表达水平。0 mmol/L 组为对照组，200 mmol/L 组、800 mmol/L 组为实验组。实验组与对照组比较，XIAP 的 RNA 表达水平降低，差异有统计学意义，➢P<0.05 vs 对照组。图 4(f)示实时荧光定量 PCR 检测 800 mmol/L 酒精予以不同时间干预后 AC16 心肌细胞 XIAP 的 RNA 表达水平。0 h 为对照组，24 h、48 h 为实验组。实验组与对照组比较，XIAP 的 RNA

表达水平降低，差异有统计学意义，➢P<0.05 vs 对照组。提示酒精能够下调 AC16 细胞中 XIAP 的蛋白和 RNA 水平，且随着酒精浓度的增加以及作用时间的延长，XIAP 的表达水平进一步降低。

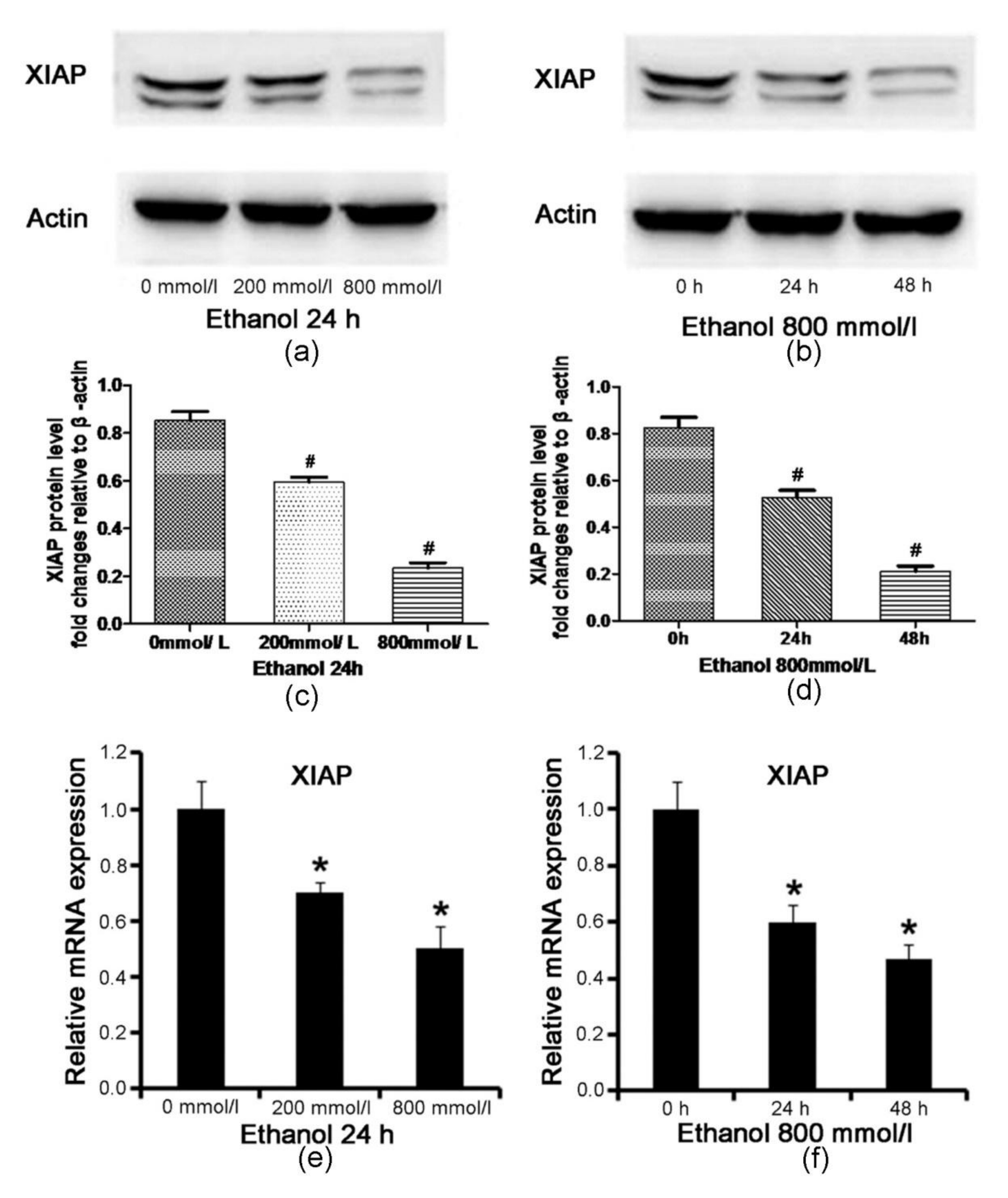


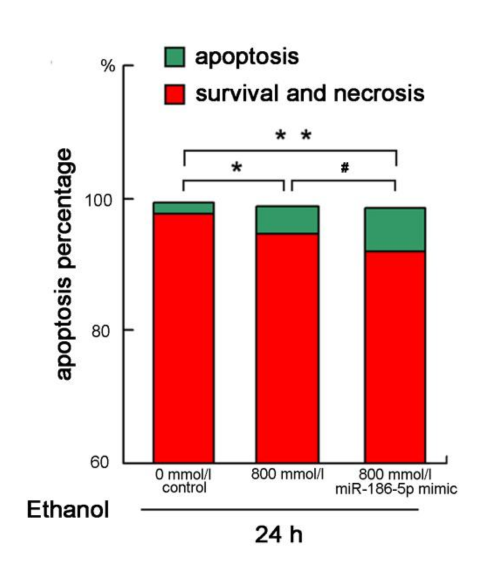
图 4 Western Blot 和实时荧光定量 PCR 检测酒精摄入后 AC16 心肌细胞中 XIAP 的表达水平。

Figure 4. Western blot and real-time PCR detect the expression levels of XIAP in alcohol-treated AC16 cardiomyocytes.

2.5 MiR-186-5p 参与酒精诱导的 AC16 心肌细胞凋亡过程

上一部分试验观察到酒精处理后的 AC16 心肌细胞出现凋亡，并发现其中

miR-186-5p 的表达量上调。为了探究 miR-186-5p 在酒精诱导心肌细胞凋亡过程中发挥的作用，首先用酒精（800 mmol/L，24 h）处理 AC16 心肌细胞，流式细胞术检测细胞凋亡水平的变化；将 miR-186-5p mimic 转染于酒精（800 mmol/L，24 h）处理的 AC16 心肌细胞中，用流式细胞术检测细胞凋亡水平的变化，结果如图 5 所示：Q2-1：此区域的细胞为坏死细胞及机械损伤的细胞；Q2-2:此区域的细胞为晚期凋亡细胞；Q2-3：此区域的细为活细胞。Q2-4：此区域的细胞为早期凋亡细胞。结果显示：0 mmol/L 组为对照组，酒精（800 mmol/L,24 h）处理后 AC16 心肌细胞的凋亡水平增加，差异有统计学意义，➤P<0.05 vs 对照组；而转染 miR-186-5p mimic 后，即上调 miR-186-5p 表达水平，心肌细胞的凋亡水平进一步增加，差异有显著统计学意义，➤➤P<0.01 vs 对照组。转染 miR-186-5p mimic 后较酒精（800 mmol/L,24 h）处理组相比，差异有统计学意义，# P<0.05。提示：酒精可诱导心肌细胞凋亡，miR-186-5p 可促进酒精诱导的心肌细胞凋亡水平进一步增加。



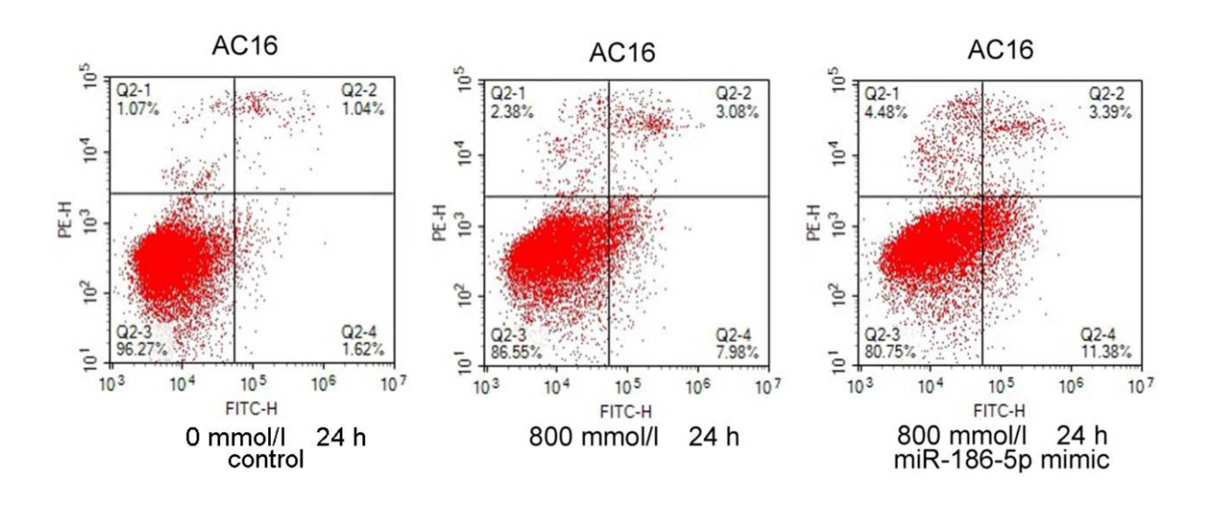


图 5 流式细胞术分析细胞转染 miR-186-5p mimic 对酒精诱导的心肌细胞凋亡水平的影响。

Figure 5. Flow cytometry analyzes transfecting miR-186-5p mimic affects the levels of alcohol-induced apoptosis of cardiomyocytes.

Q2-1: the cells in this area are necrotic cells and mechanical injury-cells;Q2-2: the cells in this area are late –stage apoptotic cells.Q2-3: cells in this area are living cells.Q2-4: cells in this area are early–stage apoptotic cells.

2.6 XIAP 表达上调可抑制酒精诱导的 AC16 心肌细胞凋亡

为了进一步探究 XIAP 在酒精诱导心肌细胞发生凋亡过程中发挥的作用，首先用酒精（800 mmol/L，24 h）处理 AC16 心肌细胞，流式细胞术检测细胞凋亡水平的变化；将 XIAP 质粒转染于酒精（800 mmol/L，24 h）处理的 AC16 心肌细胞中，用流式细胞术检测细胞凋亡水平的变化，结果如图 6 所示：Q2-1：此区域的细胞为坏死细胞及机械损伤的细胞；Q2-2:此区域的细胞为晚期凋亡细胞；Q2-3：此区域的细胞为活细胞。Q2-4：此区域的细胞为早期凋亡细胞。结果显示：0 mmol/L 组为对照组，酒精（800 mmol/L, 24 h）处理后及转染 XIAP 质粒后，即上调 XIAP 表达水平后，AC16 心肌细胞的凋亡水平均有所增加，差异有统计学意义，➤P<0.05 vs 对照组；而转染 XIAP 质粒后，心肌细胞的凋亡水平较酒精（800 mmol/L, 24 h）处理组相比有所下降，差异有统计学意义，# P<0.05。提示：酒精可诱导心肌细胞凋亡，XIAP 可部分逆转酒精诱导的心肌细胞凋亡。

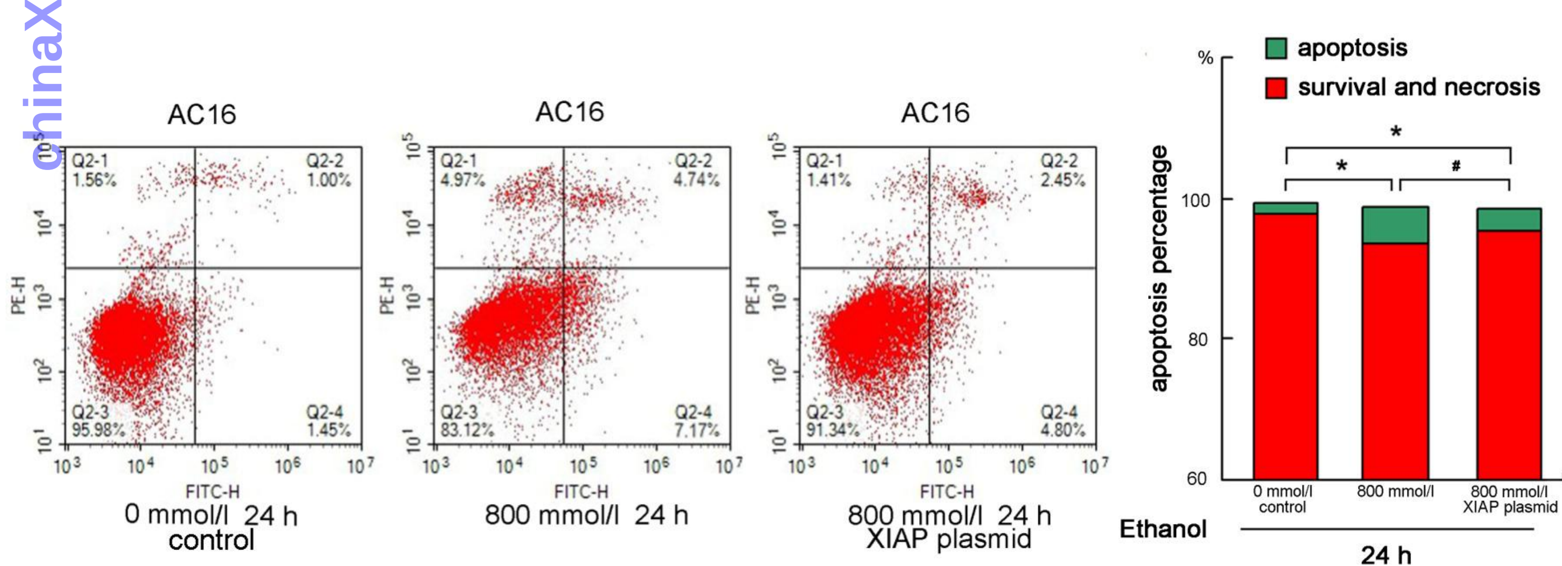


图 6　流式细胞术分析细胞转染 XIAP 质粒对酒精诱导的心肌细胞凋亡水平的影响。

Figure 6. Flow cytometry analyzes transfecting XIAP plasmid affects the levels of alcohol-induced apoptosis of cardiomyocytes.

Q2-1: the cells in this area are necrotic cells and mechanical injury-cells;Q2-2: the cells in this area are late-stage apoptotic cells.Q2-3: cells in this area are living cells.Q2-4: cells in this area are early-stage apoptotic cells.

2.7 miR-186-5p 调控 AC16 心肌细胞中 XIAP 的表达

经过以上实验我们证实了在酒精处理的心肌细胞 AC16 中 miR-186-5p 以及 XIAP 均对细胞的凋亡产生影响。通过荧光素酶报告基因 miR-186-5p 可以直接与 XIAP mRNA 的 3′-UTR(332-338)结合，进而直接抑制 XIAP 的表达。因此我们推测 AC16 心肌细胞中，XIAP 作为 miR-186-5p 的靶基因调控细胞凋亡。为了证实这种推测，我们在 AC16 心肌细胞中转染 miR-186-5p mimic，上调细胞中 miR-186-5p 的表达水平，并分别通过 Western Blot 以及实时荧光定量 PCR 的方法检测细胞中 XIAP 的表达水平。结果如图 7 所示：图 7(a)示 Western Blot 检测 miR-186-5p mimic 转染 AC16 心肌细胞，经酒精(800 mmol/L, 24 h)处理后，即上调 miR-186-5p 表达水平，细胞中 XIAP 的蛋白表达水平较对照组降低。图 7(b)Western Blot 检测 miR-186-5p inhibitor 转染 AC16 心肌细胞，经酒精(800 mmol/L, 24 h)处理后，即下调 miR-186-5p 表达水平，细胞中 XIAP 的蛋白表达水平较对照组升高。图 7(c)、图 7(d)通过曝光的灰度值计算 XIAP 蛋白表达量：800 mmol/L-24 h 组为对照组，miR-186-5p mimic 组细胞中 XIAP 的蛋白表达水平较对照组降低，差异有统计学意义，#$P<0.05$ vs 对照组；MiR-186-5p inhibitor 组细胞中 XIAP 的蛋白表达水平较对照组升高，差异有统计学意义，#$P<0.05$ vs 对照组。图 7(e)示实时荧光定量 PCR 检测 miR-186-5p mimic 转染 AC16 心肌细胞，经酒精(800 mmol/L,24 h)处理后，即上调 miR-186-5p 表达水平，细胞中 XIAP 的 RNA 表达水平较对照组降低，差异有统计学意义，➢$P<0.05$ vs 对照组。图 7(f)示实时荧光定量 PCR 检测 miR-186-5p inhibitor 转染 AC16 心肌细胞，经酒精(800 mmol/L, 24 h)处理后，即下调 miR-186-5p 表达水平，细胞中 XIAP 的蛋白表达水平较对照组升高，差异有统计学意义，➢$P<0.05$ vs 对照组。提示：miR-186-5p 使酒精处理后的 AC16 心肌细胞中 XIAP 的表达水平降低，而 miR-165-5p inhibitor 能部分逆转酒精诱导 XIAP 的表达水平降低。

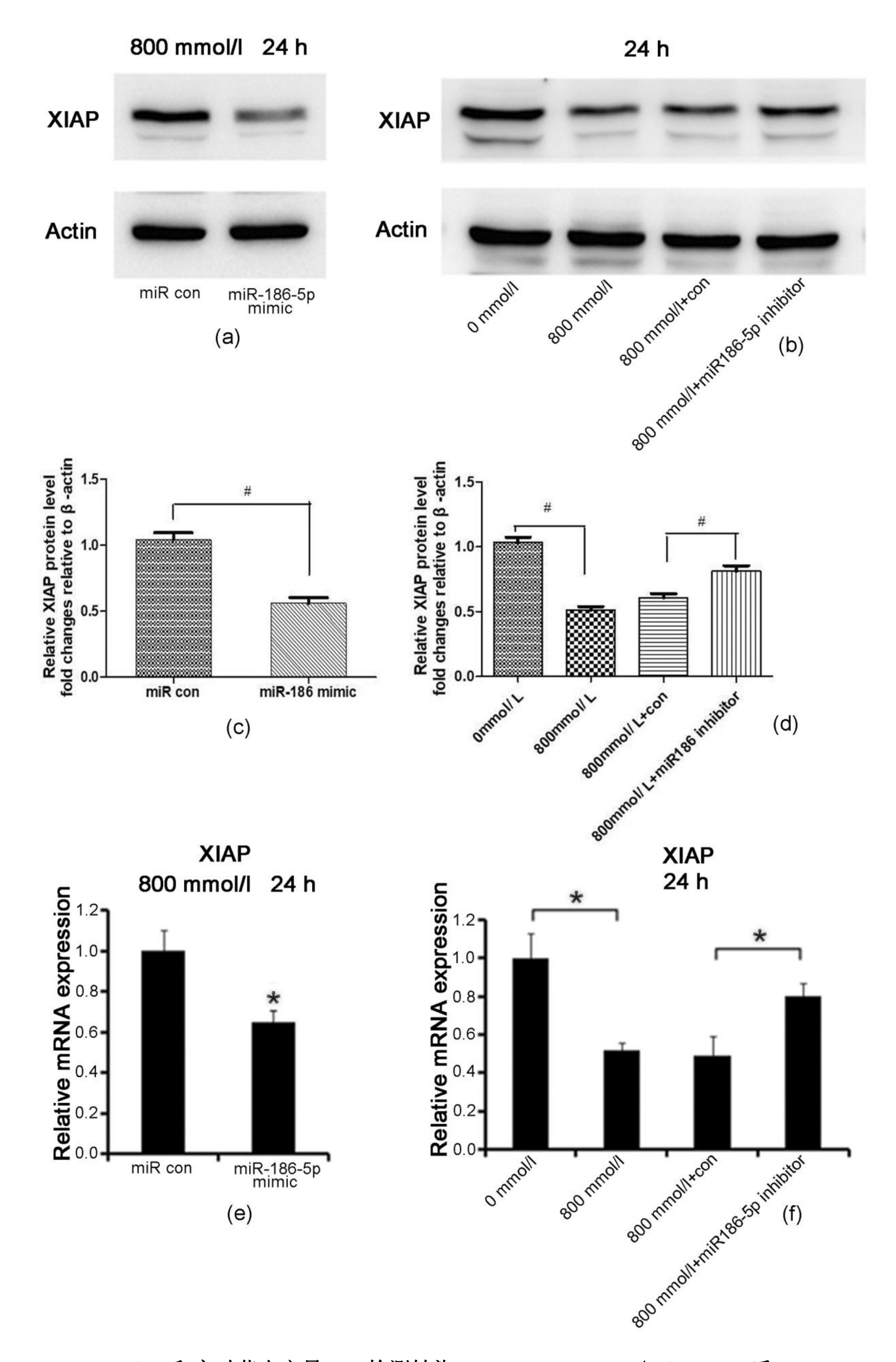


图 7 Western Blot 和实时荧光定量 PCR 检测转染 miR-186-5p mimic/inhibitor 后 AC16 心肌细胞中 XIAP 表达水平。

Figure 7. Western blot and real-time PCR detect the expression levels of XIAP in cardiomyocytes transfected with miR-186-5p mimic/inhibitor.

讨论

ACM是指长期大量摄入酒精后导致的以心脏扩大、心律失常和充血性心力衰竭为特征的心肌病变。研究表明在 ACM 的发病过程中，酒精诱导的心肌细胞凋亡发挥关键作用[8-11]。在本次研究中，我们用酒精对 AC16 心肌细胞进行处理，分析酒精对心肌细胞凋亡产生的影响。结果发现经过酒精处理，心肌细胞的凋亡水平上升。并且随着酒精处理时间和作用时间的延长，心肌细胞的凋亡水平不断上升。这些研究成果与先前的研究成果保持一致[12-15]。

在酒精诱导心肌细胞凋亡机制方面已有研究表明在 ACM 中 TNF-α，凋亡蛋白 Bax，Caspase-3 等的含量水平显著升高[16]。在本实验中发现酒精摄入可诱使心肌细胞中 XIAP 的异常表达。XIAP 是凋亡家族蛋白抑制剂（inhibitorofapoptosis family of proteins，IAP）中的一员，是当前已知的人的组织细胞中最有效的 IAP 蛋白[17-19]。XIAP 可以抑制由病毒感染或者 caspase 家族蛋白表达过量引发的细胞凋亡。我们发现 AC16 心肌细胞经过酒精处理后，细胞中 XIAP 表达水平下调。为了进一步证实 XIAP 在酒精诱导心肌细胞凋亡过程中是否发挥作用，我们通过质粒转染技术，上调了心肌细胞中 XIAP 的表达水平，结果发现心肌细胞凋亡受到抑制。

近年来，有关 microRNA 的研究多集中在疾病领域，包括疾病的发病机制，疾病的发展以及预后等。在本实验中，我们在酒精处理的心肌细胞中筛查了一部分 microRNA 的表达水平，结果发现 miR-186-5p 的表达水平显著上调。此外，在酒精诱导的心肌细胞中转染 miR-186-5p mimic，上调 AC16 心肌细胞中 miR-186-5p 的表达上调后，细胞的凋亡水平进一步上升。证实了在酒精诱导心肌细胞凋亡的过程中，miR-186-5p 发挥重要的促进作用。

在酒精处理的心肌细胞中，我们同时检测到了 miR-186-5p 和 XIAP 表达水平的异常，我们采用 DualLuciferase 报告基因实验进行分析、实时定量 PCR 进行靶基因验证野生型 pmir GLO-wt-XIAP-3′-UTR 与 miR-186-5p mimic 结合后对照其他三组荧光强度降低，提示 XIAP 的 3′-UTR 区有 miR-186-5p 直接结合的位点，miR-186-5p 可靶向抑制 XIAP 的表达，因此 XIAP 是 miR-186-5p 直接作用的靶基因共同调控酒精诱导的心肌细胞凋亡过程。为了验证这个推断，我们在酒精处理的心肌细胞中转染 miR-186-5p mimic，上调其表达量，发现 XIAP 的表达量在蛋

白质和 RNA 双水平上均下调，而在酒精处理的 AC16 心肌细胞转入 miR-186-5p inhibitor 后，发现 XIAP 的表达量在蛋白和基因双水平上均上调。

综上所述，酒精摄入可导致心肌细胞 AC16 发生凋亡，并且具有剂量和时间的依赖性。在具体作用机制方面，酒精处理后的心肌细胞中 miR-186-5p 表达上调，XIAP 表达下调，miR-186-5p 以 XIAP 为靶基因，共同调控酒精诱导的心肌细胞凋亡过程。本研究为 ACM 的防治提供药物治疗新靶点

结论

1 酒精诱导心肌细胞发生凋亡，且随着酒精浓度的增加和作用时间的延长凋亡水平进一步增加。

2 miR-186-5p 以 XIAP 为靶基因调控酒精诱导的心肌细胞凋亡，且 miR-186-5p 发挥负性调控功能，直接抑制 XIAP 的表达，从而调控酒精诱导的 AC16 心肌细胞凋亡过程。

3 酒精摄入后 AC16 心肌细胞中 microRNA-186-5p 的表达上调，XIAP 的表达下调，并呈酒精时间和浓度依赖性。

参考文献

[1] Naimi T S，Nelson D E，Brewer R D，et al.The intensity of binge alcohol consumption

amongU.S.adults. American journal of preventive medicine，2010，38(2): 201-207.

[2] Steiner J L and Lang C H. Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria，oxidative

stress and apoptosis.Int J Biochem Cell Biol，2017，89：125-135.

[3] Wang Z，Song J，Zhang L，et al.Increased expression of microRNA-378a-5p in acute

ethanol exposure of rat cardiomyocytes. Cell Stress Chaperones, 2017, 22(2): 245-252.

[4] Jing L, Lin C, Lu Y, et al. Investigation of microRNA expression profiles associated with human Alcoholic cardiomyopathy. Cardiology, 2015, 130(4): 223-233.

[5] Lai Y, Guo H, Li J, et al.Comparison of surgical results in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy after classic or modified morrow septal yectomy.Medicine (Baltimore), 2017, 96(51): 9371.

[6] Jiang J, Mo H, Liu C, et al. Inhibition of miR-186-5p contributes to high glucose-induced injury in AC16 cardiomyocytes. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 627-632.

[7] Bradford M M.A rapid and sensitive method for the quantitationof microgram quantities of protein utilizing the principle of protein—dye binding.Anal Biochem, 1976(72) : 248—254.

[8] Ji F, Liu Q and Feng Z.Genetic association between 1425G/A SNP in PRKCH and hypertrophic cardiomyopathy in a Chinese population.Oncotarget,2017, 8(70):

114839-114844.

[9] Mu J, Zhang G, Xue D, et al.Sudden cardiac death owing to Arrhythmogenic right ventri- cular cardiamyopathy.Two case reports and systematic literature review.Medicine(Baltimore), 2017, 96(47): 8808.

[10]Dahraoui S, Uwingabiye J, Belarj B, et al.Unexpected discovery ofmultiple myeloma following cardiomyopathy.Clin Case Rep, 2018,6(1): 86-90.

[11]Adachi K, ashiguchi S, Saito M, et al.Detection and management of cardiomyopathy in female dystrophinopathy carriers.J Neurol Sci, 2017: 74-80.

[12]Baltrūnienė V, Bironaitė D, Kažukauskienė I, et al.The role of serum adiponectin for outcome prediction in patients with dilated cardiomyopathy and advanced heart failure.Biomed Res Int, 2017: 1-13.

[13] Bollen IAE, van der Meulen M, de Goede K, et al.Cardiomyocyte hypocontractility and reduced myofibril density in end stage pediatric cardiomyopathy.Front Physiol, 2017, 8: 1-12.

[14]Buccheri D and G Zambelli.The link between spontaneous coronary artery dissection and takosubo cardiomyopathy.analysis of the published cases.J Thorac Dis, 2017, 9(12): 5489-5492.

[15] Fu KY, Zamudio R , Henderson-Frost J , et al.Association of capase-1 polymorphisms with Chagas cardiomyopathy among individuals in Santa

Cruz，Bolivia.Rev Soc Bras Med Trop，2017，50(4)：516-523.

[16] Edison N，Curtz Y，Paland N，et al. Degradation of Bcl-2 by XIAP and ARTS Promotes Apoptosis. Cell Rep，2017， 21(2)：442–454.

[17] Cesa LC，Shao H，Srinivasan SR，et al.X-Linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP) is a client of heat shock protein 70(Hsp 70) and a biomarker of its inhibition.J Biol Chem，2018，16(2)：7.

[18]Yang W，Zhou H and Yan Y.XIAP underlies apoptosis resistance of renal cell carcinoma cells.Mol Med Rep，2018，17(1)：125-130.

[19]Edison N，Curtz Y，Paland N，et al.Degradation of Bcl-2 by XIAP and ARTS promotes apoptosis.Cell Rep，2017，21(2)：442-454.